

DERWENT-ACC-NO: 1978-11565A

DERWENT-WEEK: 197806

COPYRIGHT 2007 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Reinforced fibrin membrane prep'd. from  
fibrinogen soln. and thrombin - for immobilisation of enzyme  
used in blood dialysis unit for leukaemia treatment

PATENT-ASSIGNEE: MHIAMA H[MHIAI] , MIHAMA H[MIHAI]

PRIORITY-DATA: 1976JP-0074017 (June 24, 1976)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES MAIN-IPC		
JP 52156912 A	December 27, 1977	N/A
000 N/A		
JP 85010716 B	March 19, 1985	N/A
000 N/A		

INT-CL (IPC): A61K009/00, A61K037/12 , C12N011/04

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 52156912A

BASIC-ABSTRACT:

Reinforced fibrin membrane is produced by contacting thrombin with a fibrinogen soln., maintaining the soln. at 30-40 degrees C to form a thin clot, and drying at <40 degrees C to a moisture content of <20%. Reaction of thrombin on the fibrinogen soln. is effected in the presence of <5 mmole calcium per 100 ml of the fibrinogen soln. The above process can include drawing the resulting fibrin membrane while wet, then <40 degrees C in the stretched state.

The fibrin membrane has no discontinuous layer in its inner part, and shows the enhanced orientation and increased strength, while maintaining the activity or function of enzyme. The process enables fixation of enzymes on fibrin as

support without modification of enzymes, and asparaginase fixed on fibrin by the process can be placed in a dialysis tube for blood of leukemia to avoid side effect of asparaginase when administered directly.

TITLE-TERMS: REINFORCED **FIBRIN MEMBRANE** PREPARATION FIBRINOGEN SOLUTION

**THROMBIN** IMMOBILISE ENZYME BLOOD DIALYSE UNIT LEUKAEMIA TREAT

DERWENT-CLASS: B04 D16 J01

CPI-CODES: B04-B02C3; B04-B04A; B04-B04J; B12-G05; D05-A01; J01-C03;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

V800 V751 V752 V753 V754 V600 V641 M430 M431 P632

M782 R000 M423 M902

①日本国特許庁  
公開特許公報

②特許出願公開  
昭52-156912

③Int. Cl<sup>2</sup>:  
A 61 K 9/00

識別記号

④日本分類  
30 C 4

厅内整理番号  
7057-44

⑤公開 昭和52年(1977)12月27日

⑥発明の数 2  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑦強化フィブリン膜の製造法

⑧特 願 昭51-74017  
⑨出 願 昭51(1976)6月24日  
⑩発明者 清水二郎

藤沢市片瀬山5-29-3

⑪出願人 美浜久春  
東京都世田谷区梅丘2丁目23番3  
6号

明細書

1. 発明の名称

強化フィブリン膜の製造法

2. 特許請求の範囲

1. フィブリノーゲン溶液にトロンビンを作用させ30~40℃に保つて薄いクロットに成形し、次いでこれを約40℃以下で水分率が20%以下になるまで乾燥することを特徴とする強化フィブリン膜の製造法。
2. フィブリノーゲン溶液にトロンビンを作用させるに際して、フィブリノーゲン溶液100ml当たり5ミリモル当量以下のカルシウムイオンの存在下で行なう特許請求の範囲第1項記載の製造法。
3. フィブリノーゲン水溶液にトロンビンを作用させ30~40℃に保つて薄いクロットに成形し、次いでこれを40℃以下で水分率が20%以下になるまで乾燥させ、さらに得られたフィブリン膜を膨潤状態の下で延伸し、伸張状態のまま約40℃以下で乾燥すること

を特徴とする強化フィブリン膜の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は強化フィブリン膜の製造法に関する。

フィブリンは、血液の凝固に際して、フィブリノーゲンにトロンビンが作用して生成する。その際、フィブリンはさらに重合し、また凝固因子ⅩⅢによる架橋反応によつてフィブリン分子の重合が促進されてフィブリン重合体（以下単にフィブリンという）を生成する。

一方、このフィブリンが生成する際におこる反応をフィブリンと酵素蛋白との結合に応用して、フィブリンを担体とした酵素の固定・不溶化の方法が最近開発された。このようにして製造された固定化酵素は固体触媒と同じように取扱うことができること、フィブリンが生成する反応は生理条件下で進行するため固定化しようとする酵素の変性が少ないこと、また血漿成分を利用しているので医薬へ応用しても異物としての作用を示さないこと等の利点がある。例えば白血病の治療薬として知られているアスピラ

(1)

(2)

ギナーゼをフィブリンに固定したものは、白血病患者の血液透析の際に透析管中に置くことで、従来のアスピラギナーゼの連続投与によつて生じる副作用を防止することができる。

ところで、フィブリンがこのような用途に利用されるためには、固定化しようとする酵素が変性をおこさない条件で、更に強化されたフィブリン膜を製造することが望まれている。

従来、フィブリン膜の製法としては、フィブリノーゲンにトロンビンを作用させて得られる寒天状のいわゆるクロットを加圧脱水あるいは加熱して成形することによりフィブリン膜を作る方法が知られており、この方法で得られたフィブリン膜は火傷の際の医薬品として用いられている。

しかしこの方法では、加熱処理によつて酵素の機能は完全に失われる。また一方加圧によつて一度崩壊されたクロットは、再加圧によつて圧着することは容易ではないばかりでなく、加圧成形した膜は力学的に内部に不連続層があり

(3)

10単位以上好ましくは100～300単位が用いられる。撒布後にグル化を開始するが、凝固因子XIIの働きを充分に促させるにはこのクロットの成形時の温度が影響し、30～40℃好ましくは約38℃で8～10時間以上恒温室に放置することが好ましい。また反応はカルシウムイオンの存在下に行なうことが望ましく、カルシウムイオンはフィブリノーゲン溶液100ml当たり5ミリモル当量以下、最適には2～3ミリモル当量の使用で最大の膜強度を得ることができ、大過剰のカルシウムイオンは逆効果となる。カルシウムイオンとしては通常塩化カルシウムが用いられる。反応はまた好ましくは中性ないし微酸性、特にpH 6.2で行なうよう緩衝液が用いられる。

次いで、このようにして得られたクロットを酵素が破壊を起す温度以下、即ち40℃以下好ましくは室温ないし0℃で、風乾または真空乾燥など適宜な手段で乾燥する。フィブリン膜の強度は水分率に依存するところが大きく、水分

(5)

強度が弱い。

本発明の方法は、フィブリノーゲン溶液にトロンビンを作用させ、30～40℃に保つて薄いクロットに成形し、次いでこれを約40℃以下で水分率が20%以下になるまで乾燥する方法である。この方法において、トロンビンを作用させるに際して、フィブリノーゲン溶液100ml当たり5ミリモル当量以下のカルシウムイオンの存在下で行なうのが好ましい。更にまたこのようにして得られたフィブリン膜を膨潤状態の下で延伸し、伸張状態のまゝ約40℃以下で乾燥する方法である。

このようにして成形されたフィブリン膜は内部に不連続層がなく、フィブリン分子の配向が向上し、フィブリン膜の強度がいちじるしく増加する。

本発明の方法を更に説明すると、フィブリノーゲン溶液を平板容器に入れてその上にトロンビン溶液を均一に撒布する。トロンビンは適宜の量が用いられるが、フィブリノーゲン1当り

(4)

率20%以下にすることによつて膜強度は急激に上昇する。ちなみにも水分率20%の膜の強度は約1000gr/mm<sup>2</sup>であるが、水分率10%では4000gr/mm<sup>2</sup>の強度が得られる。

上記のようにして得られたフィブリン膜を更に強化するには、フィブリン膜を水または適当な液中に短時間浸漬して膨潤させ、これを延伸する。膨潤はフィブリン分子の配向過程のフレキシビリティを増加させる。

延伸は膜の両端を固定して引延す方法あるいは引延しながら圧延ローラをくぐらせる方法などが採用される。延伸比は約1.5倍以上で行なわれる。伸張状態のまゝ前記と同様に乾燥してフィブリン膜を得る。膜の水分率は20%以下が好ましい。

この膨潤状態の下での延伸処理により製造されたフィブリン膜は、下記試験例にみられるように、フィブリン分子の配向が向上した結果、延伸比が1.5倍以上(A, B, C)で膜強度の増加がみられ、延伸比が2倍(D)では、延伸処理

(6)

をしない膜(D)の2倍以上に強化された。なお膨潤させずに2倍に延伸処理をした膜(D)と比較して、Aは配向性が約4倍向上した。

試料	延伸比	膜の強度 gr/mm <sup>2</sup>	複屈折* Δn	膜の厚さ mm
A	2	9846	$39.8 \times 10^{-4}$	0.065
B	1.8	5254	$32 \times 10^{-4}$	0.075
C	1.5	5093	$28 \times 10^{-4}$	0.080
(対照)				
D(延伸せず)	1.0	4000	0	0.1
E(膨潤させず延伸)	2.0		$11 \times 10^{-4}$	

\* 配向に対応する指数

本発明のフィブリン膜の製法に際して、最初の工程で酵素を添加して行えば酵素を固定化したフィブリン膜が得られ、本発明の方法においては酵素の機能を失うことなく強化フィブリン膜が製造可能である。

実施例1

pH 6.2 の緩衝液 100 ml に 2.5 g のフィブリノーゲン粉末をスターーラーにて 3 ~ 4 時間約 35°C

(7)

実施例1の方法で得たフィブリン膜を5分程度水中に浸漬し、膨潤させた膜の両端を固定し引延して2倍に延伸し、伸張状態で水分率10%となるまで風乾した。このようにして製造されたフィブリン膜の強度は 9800 gr/mm<sup>2</sup> に強化された。

特許出願人 美浜久春

特開昭52-156912(3)

で溶解し、沪紙で沪過した。この溶液に  $\text{CaCl}_2$  を 5 ミリモル当量になる様に加えた。これを 10 cm × 15 cm のメタクリル樹脂製の平底容器に注ぎ、500 単位のトロンビン結晶を 5 ml の蒸溜水に溶解した液をビベットに取り、前述したフィブリノーゲン溶液は即座にゲル化を始めるが、更に 8 ~ 10 時間 36°C の恒温室中に放置し凝固因子 XII の働きを促した。成形したクロットを扇風機の風で水分率 10% となるまで乾燥し、約 0.1 ~ 0.15 mm の厚さのフィブリン膜を得た。このようにして製造されたフィブリン膜は 4000 gr/mm<sup>2</sup> の強度を有した。

実施例2

実施例1の方法において、フィブリノーゲン溶液に  $\text{CaCl}_2$  を加えないで行つたこと以外は全く同様にしてフィブリン膜を製造した。このようにして製造されたフィブリン膜は 3000 gr/mm<sup>2</sup> の強度を有した。

実施例3

(8)

(9)